

equivalent US 4,957,744

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)特許公報 (B2)

(11)特許番号

第2648308号

(45)発行日 平成9年(1997)8月27日

(24)登録日 平成9年(1997)5月9日

| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | FI | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|--------|---------------|--------|
| C 0 8 B 37/08 | | | C 0 8 B 37/08 | |
| A 6 1 K 7/00 | | | A 6 1 K 7/00 | J |
| 9/48 | | | 9/48 | A |
| 9/70 | 3 2 9 | | 9/70 | 3 2 9 |
| 47/36 | | | 47/36 | C |
| 発明の数11(全 26 頁) 最終頁に続く | | | | |

| | | | |
|-------------|-------------------|----------|--|
| (21)出願番号 | 特願昭62-258165 | (73)特許権者 | 999999999 フィディーア・ソシエタ・ペル・アチオニ イタリア国35031アバーノ・テルメ、ヴィア・ポンテ・デラ・ファッブリカ3/A番 |
| (22)出願日 | 昭和62年(1987)10月13日 | (72)発明者 | フランセスコ・デラ・ヴァッレ イタリア国パドヴァ、ヴィア・セラート14番 |
| (65)公開番号 | 特開昭63-105003 | (72)発明者 | アウレリオ・ロメオ イタリア国ローマ、ヴィアレ・イッポクラテ93番 |
| (43)公開日 | 昭和63年(1988)5月10日 | (74)代理人 | 弁理士 青山 葆 (外1名) |
| (31)優先権主張番号 | 4 8 5 4 6 A/8 6 | 審査官 | 弘實 謙二 |
| (32)優先日 | 1986年10月13日 | | |
| (33)優先権主張国 | イタリア (IT) | | |
| 最終頁に続く | | | |

(54)【発明の名称】 ヒアルロン酸の架橋エステル

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、並びに、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩(ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない)。

【請求項2】該脂肪族多価アルコールが二価アルコールである第1項記載の架橋エステル。

【請求項3】該脂肪族多価アルコールが2-16個の炭素原子を有する第1項記載の架橋エステル。

【請求項4】該二価アルコールがエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコールおよびペンタン、ヘキサン、ヘプタンおよびオクタンから導かれるグリコール、並びにそれらの位置異性体からなる群から

2

選択される第2項記載の架橋エステル。

【請求項5】脂肪族多価アルコールが、グリセリン、エリスライトおよびペンタエリスライトからなる群から選択される第1項記載の架橋エステル。

【請求項6】該ヒアルロン酸の架橋結合していないカルボキシ基の少なくとも一個が、炭素原子数34個までの脂肪族アルコールであって、アミノ、ヒドロキシ、メルカプト、アルデヒド、ケト、カルボキシ、ヒドロカルビルおよびジヒドロカルビルアミノ基、エーテル、エステル、チオエーテル、チオエステル、アセタール、ケタール、カルバルコキシ、カルバミド基および1または2個のアルキル基によって置換されている置換カルバミド基、これら機能的に修飾された基のヒドロカルビル残基の炭素原子数は最高6個である、によって置換されていることもあり、その脂肪族アルコールの炭素原子鎖が、

酸素、硫黄および窒素からなる群から選択される異種原子によって中断されていることもある脂肪族アルコールによってエステル化されている第1項—第5項のいずれか1項に記載の架橋エステル。

【請求項7】該脂肪族アルコールがエチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール、イソブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、アミルアルコール、ペンチルアルコール、ヘキシルアルコール、またはオクチルアルコールである第6項記載の架橋エステル。

【請求項8】該ヒアルロン酸の架橋結合していないカルボキシ基の少なくとも一個が唯一個のベンゼン残基を有する芳香性脂肪族アルコールであって、その脂肪鎖の炭素原子数は最高4個であり、ベンゼン残基は1—3個のメチルまたはヒドロキシ基、又はハロゲン原子で置換されていることもあり、脂肪鎖は、遊離の、またはモノメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ピロリジン基およびピペリジン基からなる群から選択される1またはそれ以上の機能的な基で置換されていることもある、芳香性脂肪族アルコールによってエステル化されている第1項—第5項のいずれか1項に記載の架橋エステル。

【請求項9】該ヒアルロン酸の架橋結合していないカルボキシ基の少なくとも一個が、炭素原子数34個までの単環式または多環式炭水化物から導かれる環状脂肪族アルコールまたは脂肪族—環状脂肪族アルコールであって、アミノ、ヒドロキシ、メルカプト、アルデヒド、ケト、カルボキシ、ヒドロカルビルアミノおよびジヒドロカルビルアミノ基、エーテル、エステル、チオエーテル、チオエステル、アセタール、ケタール、カルバルコキシ、カルバミド基および1またはそれ以上のアルキル基によって置換されている置換カルバミド基、これらの機能的に修飾された基のヒドロカルビル基の炭素原子数は最高6個である、によって置換されていることもあり、更に、炭素原子鎖が酸素、硫黄および窒素からなる群から選択される異種原子によって中断されていることもあり、また、1またはそれ以上の芳香性結合を有していることもあるアルコールによってエステル化されている第1項—第5項のいずれか1項に記載の架橋エステル。

【請求項10】該架橋結合していないカルボキシ基の少なくとも一個がコーチゾン、ヒドロコーチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、フルオロコーチゾン、デキサメサゾン、ベータメサゾン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、パラメサゾン、フルメサゾン、フルシノロンおよびそのアセトニド、フルプレドニリデン、クロベタゾールおよびベクロメサゾンからなる群から選択されるアルコールによってエステル化されている第9項記載の架橋エステル。

【請求項11】該架橋エステルと、アルカリまたはアルカリ土類金属、マグネシウムまたはアルミニウムとの塩である第1項—第10項のいずれか1項に記載の部分的エ

ステルの塩。

【請求項12】ナトリウムまたはアンモニウム塩である第11項記載の架橋エステルの塩。

【請求項13】アンモニウム、芳香性脂肪族、環状脂肪族または複素環基から導かれる、第1項—10項のいずれか1項に記載の部分的エステル。

【請求項14】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、または、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩（ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない）を含有する衛生、医療、または外科用器具材料。

【請求項15】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、または、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩（ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない）をビヒクルとし、薬学的に活性な物質と混合してなる医薬組成物。

【請求項16】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、または、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩（ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない）であって、

(1) 該ヒアルロン酸の架橋結合していないカルボキシ基の少なくとも一個が唯一個のベンゼン残基を有する芳香性脂肪族アルコールであって、その脂肪鎖の炭素原子数は最高4個であり、ベンゼン残基は1—3個のメチルまたはヒドロキシ基、又はハロゲン原子で置換されていることもあり、脂肪鎖は、遊離の、またはモノメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ピロリジン基およびピペリジン基からなる群から選択される1またはそれ以上の機能的な基で置換されていることもある、芳香性脂肪族アルコールによってエステル化されている架橋エステルまたはその塩であるか、または

(2) 該ヒアルロン酸の架橋結合していないカルボキシ基の少なくとも一個が、炭素原子数34個までの単環式または多環式炭水化物から導かれる環状脂肪族アルコールまたは脂肪族—環状脂肪族アルコールであって、アミノ、ヒドロキシ、メルカプト、アルデヒド、ケト、カルボキシ、ヒドロカルビルアミノおよびジヒドロカルビルアミノ基、エーテル、エステル、チオエーテル、チオエステル、アセタール、ケタール、カルバルコキシ、カルバミド基および1またはそれ以上のアルキル基によって置換されている置換カルバミド基、これらの機能的に修飾された基のヒドロカルビル基の炭素原子数は最高6個である、によって置換されていることもあり、更に、炭素原子鎖が酸素、硫黄および窒素からなる群から選択される異種原子によって中断されていることもあり、ま

た、1 またはそれ以上の芳香性結合を有していることもあるアルコールによってエステル化されている架橋エステルまたはその塩を含有する医薬組成物であって、該架橋結合していないカルボキシ基でエステル化されたアルコールが、薬学的に活性なアルコールである医薬組成物。

【請求項 1 7】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、または、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩（ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない）を活性成分とする化粧品。

【請求項 1 8】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、または、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩（ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない）を化粧品用ビヒクルとして含有する化粧品。

【請求項 1 9】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、または、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩（ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない）を含有する衛生、医療または外科用製品。

【請求項 2 0】治療上不活性なアルコールから導かれる架橋エステルのフィルムを含有する第19項記載の衛生、医療または外科用製品。

【請求項 2 1】治療上不活性なアルコールから導かれる架橋エステルの糸を含有する第19項記載の衛生、医療または外科用製品。

【請求項 2 2】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、または、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩（ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない）を含有する薬物用のカプセルまたはマイクロカプセル。

【請求項 2 3】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、または、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩（ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない）を人工の皮膚として皮膚科学において用いるためのフィルムの製造に使用する方法。

【請求項 2 4】ヒアルロン酸と脂肪族多価アルコールとの完全なまたは部分的な架橋エステル、または、そのような部分的架橋エステルの無機または有機塩基の塩（ただし、該架橋エステルは、ヒアルロン酸とアロメチルオキシラン又はビスエポキシ化合物との架橋エステルではない）を外科手術に用いるために、縫合糸の製造に使用

する方法。

【請求項 2 5】中性溶媒中でヒアルロン酸のカリウム、ナトリウムまたは4級アンモニウム塩とエーテル化剤とを反応させることからなる完全または部分的なヒアルロン酸の架橋エステルの製造方法。

【請求項 2 6】ヒアルロン酸の該塩がナトリウムまたはカリウム塩であり、反応を触媒量の4級アンモニウム塩の存在下で行うことからなる第25項記載の方法。

【請求項 2 7】該4級アンモニウム塩がヨウ化テトラブチルアンモニウムである第26項記載の方法。

【請求項 2 8】該中性溶媒がジアルリルスルホキシド、ジアルキルカルボキシルアミド、低級脂肪酸の低級アルキルのジアルキルアミドである第25項—第27項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 9】該多価アルコールが脂肪族多価アルコールであり、該エーテル化剤が脂肪族多価アルコールのアルキルハロゲン化物である第25項—第28項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 0】該脂肪族多価アルコールが二価アルコールである第29項記載の方法。

【請求項 3 1】該脂肪族多価アルコールがエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、およびペンタン、ヘキサン、ヘプタンおよびオクタンから導かれるグリコール類およびそれらの位置異性体、グリセリン、エリスライトおよびペンタエリスライトからなる群から選択されるものである第29項記載の方法。

【請求項 3 2】該ヒアルロン酸またはヒアルロン酸の該部分的架橋エステルの架橋結合していないカルボキシ基を脂肪族、芳香性脂肪族または環状脂肪族アルコールでエステル化する第25項—第31項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 3】該架橋結合していないカルボキシ基でエステル化されたアルコールが薬理学的に活性なアルコールである第32項記載の方法。

【請求項 3 4】少なくとも一個の遊離のカルボキシ基を有する該部分的架橋エステルがアルカリ金属またはアルカリ土類金属、マグネシウムまたはアンモニウムで塩化されている第25項—第33項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 5】該ヒアルロン酸が平均分子量50,000—730,000の画分であり、実質上、平均分子量30,000以下のヒアルロン酸を含有しないものである第25項—第34項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 6】ヒアルロン酸画分の平均分子量が50,000—100,000、250,000—350,000、または500,000—730,000である第35項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景および産業上の利用分野

本発明は、ヒアルロン酸多糖類の2またはそれ以上のカルボキシ基で多価アルコールをエステル化することに

より得られた、ヒアルロン酸の多価アルコールエステルに関するものであって、このエステルは、同一または別個のヒアルロン酸分子のカルボキシ基間に架橋結合が存在することにより「架橋エステル」と記述され得る。これらの架橋エステルは、完全、または部分的であり、後者の場合には架橋結合を形成することなく一価または多価アルコールによってさらにカルボキシ基がエステル化され得る（以後、このエステルを「単エステル」と記載する）。いずれのタイプの部分的架橋エステルにおいても、エステル化されていないカルボキシ基は遊離の状態、あるいは金属または有機塩基の塩のいずれであつてもよい。

また本発明は医薬および化粧品分野において、衛生および外科用製品を製造するために、新規なヒアルロン酸の架橋エステルを生物分解性のプラスチック材料分野に利用することに関するものであり、従って、本発明はそのような分野で同物質から製造される様々な製品を包含するものである。この新規なエステルの具体的な用途は、架橋エステル化の程度、即ち上記の多価アルコールによってエステル化されたカルボキシ基の架橋結合した基の数、単エステル化された基の数、並びに最終的には、塩化された基の数と関連して考察されるものであり、エステル化または塩化の程度はそれ自体、生成物の溶解度および生成物の粘弾性に関連している。例えば、完全な架橋エステルは実質上、水性溶液に不溶性であり、その分子の構造から、プラスチック材料または合成樹脂の製造に用いる上で、又、それらの物質の添加物として極めて適している。平均的またはそれ以下のエステル化率のエステル、並びにその無機または有機塩基による塩は多少なりとも水性条件下で可溶性であり、化粧品および医薬の両者、並びに一般的な医療・衛生分野で有用なゲルの製造に適している。

ヨーロッパ特許出願第0161887（1985年5月3日、1985年11月21日公開）には、「多官能性」と記されたエポキシ化合物との反応によって得られたヒアルロン酸の架橋誘導体がいくつか記載されている。上記特許公開において、「多官能エポキシ化合物」なる語句は、少なくとも一個のエポキシ官能基を有し、更に、エポキシ官能基内に転換可能な官能基を有し、エポキシ基を介して架橋反応が起こり得る炭化水素を意味している。この特許においては、そのような官能基の内、ハロゲンのみが言及されている。上記特許明細書中には、このような多官能性エポキシ化合物の内、数例しか挙げられていない。即ち、エピクロロヒドリン、エピブロモヒドリン、メチルエピクロロヒドリン、メチレンエピブロモヒドリン、1, 2-ビス（2, 3-エポキシプロポキシ）-エタン、1, 4-ビス（2, 3-エポキシプロポキシ）-ブタン、1, 6-ビス（2, 3-エポキシプロポキシ）-ヘキサン、並びにビスフェノールAおよびビスフェノールFのグリシジルエステルが挙げられている。この特許出願に用いられてい

る製造方法は、特許請求の範囲において、ハロメチルオキシランまたはビスエポキシ化合物の使用に限定されており、又、可能な応用例は低エステル化率のヒアルロン酸の架橋エステルを得ることに限定されている。実際、この特許出願の実施例によると、エピクロロヒドリンを反応させた場合（実施例4）、最高4%のエステル化率が達成され、低溶解性の生成物が得られている。

本発明はエステル基が水酸基で置換されていない基を含んでいる特殊なエステル類（上記エポキシドとヒアルロン酸またはその塩との反応生成物の場合）をも含めて、広範囲におよぶ架橋エステルの組み合わせを提供するものである。重要な点としては、本発明は、交差縮合したエステル基と交差結合していない幾分かのエステル基とを含有するエステル基の混合物であつて、交差結合している基の割合がヒアルロン酸の二糖単位全体の10%以上である、混合エステルを提供するものである。

英国特許出願第2151244A（1984年8月13日、1985年7月17日公開）および独国特許出願第3434082A1（1984年9月17日、1985年7月11日公開）には、ホルムアルデヒド、ジメチロールウレア、ジメチロールエチレンウレア、ポリアジリジン、ポリイソシアネート、及びジビニルスルホンとヒアルロン酸に作用させて得られるヒアルロン酸の架橋誘導体が幾つか記載されている。そのような誘導体は不溶性であり、その生物適合性の故に、生体内で用いる心臓弁、または血管クリップ等の形の様々な補助物質として、あるいはそれら製品の製造に用いられる様々な高分子材料に添加して用いることが提唱されている。同じ特許中には、「架橋」を達成するための試薬としてエチルオキシドを用いることが提案されているが、その方法は示されておらず、また、得られた生成物のタイプも明らかにされていない。他の架橋誘導体の構造は明記されていず、又、架橋を形成している結合のタイプについての記載もない。ホルムアルデヒドおよび上記の置換尿素の場合、セミアセタール構造を有するヒアルロン酸のカルボキシ基が関与した誘導体であり、他の場合は、水酸基のアルキル化産物であることを意味するといえる。

従って、本発明の主たる目的は、ヒアルロン酸と脂肪族系多価アルコールとの完全、または部分的な架橋エステルにあると明言し得る。部分的な架橋エステルにおいては、カルボキシ基は脂肪族系、脂環系、芳香性脂肪族系、または複素環系の一価または多価アルコールによってエステル化されていてよく、部分的エステル中には、エステル化されていない、無機または有機塩基によって塩化されたカルボキシ基が存在してよい、ただし、ヒアルロン酸へのハロメチルオキシランまたはビスエポキシ化合物の作用によって生成される架橋エステルは除く。

発明の詳しい記載

「ヒアルロン」という語句は文献中ではD-グルクロ

ン酸とN-アセチル-D-グルコサミン酸残基からなる、天然に存在している様々な分子量の酸性多糖類に用いられており、それは細胞表面、脊椎動物の結合組織の塩基性細胞外物質、関節の髄液、眼球内液、ヒトさい帯および鶏のとさか等に存在している。ヒアルロン酸は生物において、皮膚、けん、筋肉および軟骨のごとき多くの組織細胞の機械的な支持体として重要な役割を担っており、従って、細胞内マトリックスの主成分であるが、それはまた、組織の保湿、潤滑化、および細胞の移動、細胞機能、および細胞の分化等の他の生物学的プロセスにも重要な役割を担っている（例、バラズら (A. Balazs) 「コスメチックスおよびトイレットリース (Cosmetics and Toiletries)」 イタリアンエディションNo5/84, p.8-17)。

ヒアルロン酸は、上記の天然組織、例えば鶏のとさか、あるいはある種の細菌からも抽出し得る。今日では、ヒアルロン酸は、微生物学的手法によっても得られる。抽出によって得られる全ヒアルロン酸の分子量は約 $8-13 \times 10^6$ である。しかしながら、この多糖類の分子鎖は例えば機械的手段、放射線照射の影響下、あるいは加水分解、酸化または酸素剤等の様々な物理学および化学的因子による手段によって極めて容易に分解される。この理由によって、原抽出物に通常の精製法を適用しても、分解された分子量の小さい画分（フラクション）が得られる（バラズら、前出）。

ヒアルロン酸、その分子画分、およびその塩は医薬として用いられており、それらを化粧品として用いることが提唱されている（上記、バルツらの記事、並びに仏特許第2478468号参照）。治療薬として、ヒアルロン酸およびその塩は特に、関節症、例えば獣医学分野で馬の関節炎の治療に用いられてきた「アクタ・ベタ・スカン (Acta Vet. Scand.) 167, 379 (1976)」。天然の器官および組織の補助および代用物質として、ヒアルロン酸、その分子画分、およびその塩は眼科学の分野で用いられてきた [バルツ等、「眼科学における近年の問題 Modern Problems in Ophthalmology」 10, 1970, p3, ストリエフ (E. B. Strieff)、カーガー (S. Karger) 編、バーセル (Basel)、または「ビスコサージャリーおよび小室内レンズ移植術中におけるヒアルロン酸ナトリウムの使用 (Viscosurgery and the Use of Sodium Hyaluronate During Intraocular Lens Implantation)」、眼内移植に関する国際会議及び第1回フィルムフェスティバル (カンヌ、1979) における論文、およびHYの眼科学における使用に関する文献の要約を含んだ米国特許第4,328,803、並びに米国特許第4,147,973参照]。EP公開第0138572A3 (1985年4月24日) には例えばヒアルロン酸分子画分のナトリウム塩を眼内、および関節結合部に、それぞれ、眼内の眼球内液の代わりとして、又、関節炎の治療のために用いるのに適していることが記載されている。

又、ヒアルロン酸は、ポリウレタン、ポリエステル、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシロキサン、ビニルおよびアクリルポリマー、及びカーボンファイバー等の衛生及び外科用製品に用いられる種々の高分子材料の添加剤として用いると、これら材料の生物への適合作用を現すことができる。この場合、HYまたはその塩の添加は、例えば、そのような材料の表面を被覆する、またはそのような材料中に拡散させる等によって、有効に行える。そのような材料は様々な衛生及び医療製品、例えば心臓弁、眼内レンズ、血管クリップ、ペースメーカー、および同様の製品の製造に用いられる（米国特許第4,500,676参照）。

「ヒアルロン酸」という語句は通常、實際上、これまでに見られるように、D-グルクロン酸及びN-アセチル-D-グルコサミン酸残基が変化した、分子量の異なる一連の多糖類の全て、あるいはその分解された画分にも不正確に用いられているので、「ヒアルロン酸類」と、複数形で用いるほうがより正確である。しかしながら、本明細書では分子画分の場合も同様に、すべて同じこの語句で表すこととし、更に、「HY」なる省略形をも頻繁にも用いる。

脂肪族アルコール、芳香性脂肪族アルコール、環状脂肪族アルコールあるいは複素環式アルコールのエステルの特性は酸性多糖類自身の特性と同様か、またはそれより優れており、それらは上記の用途に一層適していると言える。そのようなエステル類、及びその製造方法は同時出願の米国特許第881,454 (1986年7月2日出願) に記載されている。エステル化の程度の高いエステル、とりわけ完全にエステル化されたエステルは、ヒアルロン酸と異なり、例えばジメチルスルホキシドのような有機溶媒に易溶である。従って、例えば、HYのペンジルエステルは室温で200mg/ml程度、DMSOに溶解する。このようなある種の有機溶媒にたいする溶解性、並びに特別なそして著しい粘弾性により、生理食塩水に不溶性の、特に好ましい形の衛生、医療および外科材料を得ることができる。まず、有機溶媒中でHYエステルの溶液を得、ついでこの非常に粘度の高い溶液を最終製品に好ましい形に成形し、最後に当初の有機溶媒とは混ざり合うが、HYエステルはそれに溶けることのない他の有機溶媒でその有機溶媒を抽出する。これらの利点は本発明の架橋化合物においてより多く認めることができた。

本発明の架橋エステルは脂肪族系の多価アルコールから得られるが、これらの誘導体は最高8個のアルコール官能基を有し、特にそのような官能基を4個有する炭素原子数16までの多価アルコールから導かれるものが好ましい。「多価」という語句は、厳密に言えば、一般に3またはそれ以上の水酸基を有するアルコールを指し「二価」、または「グリセロール」という語句は一般に2個の水酸基を有するアルコールを指す。しかしながら、本明細書では「多価」という語句を2またはそれ以上の水

酸基を有するアルコールを包含するものとして用いる。従って、「多価」アルコールという語句は二価アルコール、三価アルコール、四価アルコール、五価アルコール、および六価アルコールを意味する。これらの内、グリセリン、3種のエリスライト異性体、ペンタエリスライト、4種のキシリトール異性体および10種のダルシトール異性体の特記すべきものである。

新規なエステルにおいて、「架橋結合」は、上記の様々な多価アルコールから導かれるが、すべての「架橋結合」が同じ多価アルコールから導かれるようにエステルを調製することが好ましい。

最も重要な新規エステルは二価アルコール、即ち、グリコール類、から導かれるものである。そのようなグリコール類としては、前記の炭素原子数が16個までのもの、とりわけ8個までのものが好ましく、特にエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、及びペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタンから導かれたグリコール類、及びそれらの位置異性体が特に好ましい。しかしながら、そのようなグリコール類は1-3個の二重結合を有していてもよい。

架橋結合した基に付加的に存在し得る単エステル基は脂肪族系、芳香性脂肪族系、環状脂肪族系アルコールあるいは複素環式アルコールから導かれ、置換された、または置換されていない、あるいは、飽和または不飽和であつてもよい。脂肪族系アルコールは例えば、炭素原子数34までの飽和または不飽和アルコールであつてよく、又、アミノ、ヒドロキシ、アルデヒド、ケト、メルカプト、カルボキシ基のごとき他の遊離の機能的な基または機能的に修飾された基、あるいはこれらから導かれる基、例えば、ヒドロカルビルまたはジヒドロカルビルアミノ基（ここに、又、これ以後「ヒドロカルビル」という語句は、 $-C_nH_{2n+1}$ タイプの一価の炭化水素基のみならず、「アルキレン」、 $-C_nH_{2n+1}$ または「アルキリデン」、 $>C_nH_{2n}$ 等の二価または三価の基をも意味するものとする）、エーテルまたはエステル基、アセタールまたはケタール基、チオエーテルまたはチオエステル基、およびエステル化されたカルボキシ基またはカルバミジン基、および1または2個のヒドロカルビル基、ニトリル基またはハロゲンによって置換されたカルバミジン基等によって置換されていてもよい。置換アルコールの内、上記の官能基から選択される1または2個を有するアルコールが好ましい。

上記のヒドロカルビルを含んだ基の内、炭素原子数が6個までのアルキルのごとき低級脂肪族基のものが好ましい。又、そのようなアルコール類は、その炭素原子鎖が酸素原子、窒素原子、または硫黄原子等のヘテロ原子によって中断されていてもよい。上記のアルコール群の内、本発明に限って優先的に用いられるのは、炭素原子数12、とりわけ6個までのものであつて、置換された上記のヒドロカルビル基、記述のアミノ、エーテル、エス

テル、チオエーテル、チオエステル、アセタール基、炭素原子数4個までのアルキル基を有するケタール基で置換されたもの、又、エステル化されたカルボキシ基、置換されたカルバミジン基でも同様であり、ヒドロカルビル基は同数の炭素原子を有するアルキル、ここに、アミノまたはカルバミジン基は8個までの炭素原子を有するものである。これらのアルコールの内、第一にまたは真先に言及されるべきものはメチル、エチル、プロピル、イソプロピルアルコール、 n -ブチル、イソブチル、 t -ブチルアルコール、アミルアルコール、ペンチル、ヘキシル、オクチル、ノニルおよびドデシルアルコールのような飽和かつ非置換アルコール、特に n -オクチル、 n -ドデシルアルコールのような直鎖アルコールである。

置換アルコールの内、好ましいのは既述の、さもないければ「架橋結合」の形成に使用されるグリコール類であるが、グリセリンのような多価アルコール、タルトロニルアルコールのようなアルデヒドアルコール、乳酸のようなカルボキシアアルコール、例えば α -オキシプロピオン酸、グリコール酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アミノエタノール、アミノプロパノール、 n -アミノブタノール等のアミノアルコール類、及びそれらのアミノ基のジメチルおよびジエチル誘導体、コリン、ピロリジニルエタノール、ピペリジニルエタノール、並びに n -プロピルアルコールまたは、 n -ブチルアルコールの対応する誘導体、モノチオエチレングリコールまたはメルカプト基のエチル誘導体の如き、そのアルキル誘導体も好ましい。例えば、飽和高級脂肪族アルコールの内、セチルアルコールやミリチルアルコール等が好ましいが、本発明の目的にとって特に好ましいのは1または2個の二重結合を有する高級不飽和アルコール、とりわけ、多くの精油に含有されておりシトロネロール、ゲラニオール、ネロール、ネロリドール、リナロール、ファルネソール、及びフィトール等のテルペン類に親和性を有するアルコールである。不飽和低級アルコールの内、アリルアルコールおよびプロパルギルアルコールが有用である。

芳香性脂肪族アルコールの内、特記すべきは、唯一個のベンゼン残基を有し、脂肪鎖の炭素原子数が最高4個であり、ベンゼン残基が1-3個のメチル基、水酸基またはハロゲン原子、とりわけ塩素、臭素、ヨウ素によって置換されており、脂肪族鎖が遊離のアミノ基、モノまたはジメチル基、あるいはピロロジニルまたはピペリジニン基から選択される1またはそれ以上の基によって置換されていることもあるすべてのアルコールである。これらのアルコールの内、ベンジルアルコール及びフェネチルアルコールが最も好ましい。

環状脂肪族系アルコール（環状脂肪族アルコール-脂肪族アルコールをも含めて）は、単環または多環系炭化水素から導かれ、炭素原子数が34個までのものであるこ

とが好ましい。置換アルコールの場合、置換基は脂肪族アルコールについて述べた置換基であってよい。

モノアニューラー（一本輪）環状炭化水素から導かれるアルコールの内、特記すべきは、炭素原子数12個までであって、環炭素原子数が5-7個の、メチル、エチル、プロピル、またはイソプロピル等の1-3個の低級アルキル基によって置換されていてよい。このようなアルコール群の内、特に好ましいのは、シクロヘキサノール、シクロヘキサンジオール、1,2,3-シクロヘキサントリオール、1,3,5-シクロヘキサントリオール（フロログルシトール）、およびイノシトールである。複素環アルコールは、線状または環状鎖が例えば、基： $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N=$ 及び $-NH-$ によって形成される基から選択される1-3個の異種原子のような1-3個の異種原子によって中断されており、1またはそれ以上、特に1-3個の2重結合を有しており、環状脂肪族または環状脂肪族-脂肪族アルコールから導かれると考えてよく、従って、芳香環構造を有する複素環化合物に包含される。それらはフルフリルアルコールのような簡単なアルコール、または多くのアルカロイド誘導体および多くの医薬に含まれているようなより複雑な構造のアルコールであってよい。

既述の如く、本発明の新規な架橋誘導体は、上記の同時出願に係る米国特許出願に記載のヒアルロン酸またはその塩、あるいは上記エステルに適した主要な適用例全てに使用しうる。従って、既に述べたように、この新規な誘導体は、特に、

- 1) 医薬
- 2) 医薬の製薬用賦形剤
- 3) 化粧品及び化粧品用の賦形剤
- 4) 衛生、医療、及び外科用のプラスチック製品の製造に有用であり、本発明は、これらのすべてにおける使用例を包含するものである。

架橋エステルの型は、明らかに、それがおかれる用途に応じて選択される。通常、全てのヒアルロン酸がエステル化された、高いエステル化率の場合には親和性が増し、従って水溶性は減少する。治療または化粧品に用いるためには、十分な水溶性を有するが、ヒアルロン酸またはその塩に比べて親和性に優れているよう、エステル化の程度を調整することが重要である。通常、エステル化される成分そのものの分子量は、逆比例関係によって水への溶解性に影響するので、それを銘記しておくべきである。医薬への使用に関する限り、親水性または親油性の程度は、処置すべき組織のタイプとの関連において考察されるべきであり、例えば、皮膚の場合は、真皮性医薬である。

本発明の新規な架橋誘導体は、ヒアルロン酸に固有の性質に基づいて、例えば、ヒトの医療および獣医学における関節症の治療薬として用い得る。この場合、それらは薬理作用がまったく無いか、または無視しうる程度で

ある多価アルコール、特に、炭素原子数2-8個の二価アルコールから導かれ、また、存在しうる他の単エステルは例えば、炭素原子数8個までの一価脂肪族アルコールの如き薬理作用のないアルコールから導かれる。投与方法は非経口、より正確には、経関節投与が有効である。

本発明の他の架橋誘導体は、薬理作用のあるアルコールから導かれるものであってよく、このことは特に、それから誘導されている単エステルに関して正しい。それらの誘導体は、アルコールと質的に似通った性質を有しているが、活性域はより分化されており、バランスのよい、一定で規制的な薬理作用が確実なものとなっており、通常、著しい「遅延」効果を有している。また、他の架橋誘導体は、それ自身、薬理作用を有するかまたは有しない、2またはそれ以上の異なるタイプのアルコールによる単エステルを含有していてもよい。異なるタイプのアルコールを適当な割合に処方することにより、ヒアルロン酸の特異活性を有さず、薬理学的に活性なアルコールの所望の活性、及び特性に関する上記の安定性と生物利用性を有する、薬理活性なアルコールのエステルを得ることができる。

本明細書に記載の薬理学的に活性なアルコールから導かれた誘導体において、架橋結合したヒアルロン酸分子は、基本的には薬理活性な成分の賦形剤として作用するので、それらもまた、2) および3) 群に分類され得る。新規な架橋誘導体は2) および3) での使用において、実質的に賦形剤として作用するので、それらはまた、上記の治療上非活性な多価アルコールから導かれていることが好ましく、さらに、一価アルコールから導かれたエステル基は薬理活性の全く持たないことが好ましい。活性物質と新規誘導体とを物理的に混合して得られる医薬は、通常の医薬製剤に含有されている成分及び賦形剤をも含有してよい。一個の活性物質の代わりに活性物質の会合物（アソシエーション）を用いてもよい。この種の医薬の内、特に重要なものは、ヒアルロン酸誘導体が賦形剤として作用し、局所活性を有する物質を含有している医薬である。

本発明の新規な誘導体内で架橋結合を形成せずに、カルボキシ基のエステル化に用いられる薬理活性なアルコールは、既述のリストとは別個に、例えば、性ホルモンおよびその合成同族体、特にコルチコステロイド及びその誘導体等のステロイド類の如き脂肪族-環状脂肪族多価アルコールであり、例えば、エストラジオール及びそのメチル誘導体、17位におけるエチニルまたはプロピニル誘導体、17- α -メチルテストステロン、17- α -エチニルテストステロン、1',1,2-デヒドロテストステロン、nor-ゲストレル、19-nor-テストステロン、19-nor-17- α -メチルテストステロンのようなテストステロン及びその誘導体、サイプロテロン (cyproterone) のような抗ホルモン、コルチゾン、ハイゾ

ロコルチゾン、デキサメサゾン、ベタメサゾン、パラサメゾン、フルメサゾン、フルオシロノン、クロベタノール、ベクロメサゾン、アルファキソロン、ボラステロンである。その他の治療上活性なアルコールは、例えば、アセロフトール、ビタミンD₂及びD₃、アノヌリン、ラクトフラビン、アスコルビン酸、リボフラビン、チアミン及びパントテン酸等のビタミン類である。複素環アルコールの内、アトロピン、スコポラミン、シンコニン、シンコニジン、キニン、モルフィン、コデイン、ナロルフィン、N-ブチルスコポールアンモニウムブロミド、アジュマリン；エフェドリン、イソプロテレノール、エピネフィリンのようなフェニルエチルアミン、パーフェナジン、ピボチアジン、カルフェナジン、ホモフェナジン、アセトフェナジン、フルフェナジン、N-ヒドロキシエチルプロメタジン クロリドのようなフェノチアジン薬物、フルペンチキソール (flupentixol) 及びクロペンチキソールのようなチオキサントエン医薬；メプロフェンジオールのような抗けいれん剤、オピプラモールのような抗精神薬、オキシペンジルのような制吐剤、カルベチジン、フェノピリジンおよびメタドールのような鎮痛剤；エトドロキシンのような催眠薬；ベンズヒドロール及びジフェメトキシジンのような食欲減退剤；ヒドロキシジンのようなマイナートランクライザー；シナメドリン、ジフィリン、メフェネシン、メルカルバモール、クロルフェネシン、2,2-ジエチル,3-プロパンジオール、グアヤフェネシン、ヒドロルアミドのような筋弛緩剤；ジピリダモールおよびオキシフェドリンのような冠血管拡張剤；プロパノロール、チモロール、ピンドロール、ブプラノロール、アテノロール、メトプロロール、プラクトロールのようなアドレナリン遮断薬；6-アザウリジン、シタラビン、フロクスウリジンのような抗新生物剤；クロラムフェニコール、チアンフェニコール、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、リンコマイシンのような抗生物質；ヨードキシウリジンのような抗ウイルス剤；イソニコチニルアルコールのような抹消血管拡張剤；スルオカルビレートのような炭酸脱水酵素阻害剤；チアラミドのような抗喘息および抗炎症剤；2-p-スルファニルアニリノエタノールのようなルファ剤をも挙げることができる。

本明細書に記載の新規な加工誘導体は、当然ながら、遊離のアルコールと同様の場合にも使用され得る。

本発明の特に重要な点は、今日までに得られたものよりも安定な医薬を調製しうる点にある。従って、一方では、ヒアルロン酸自身に典型的な特徴によって用いられる架橋誘導体を製造する事ができ、例えば、関節内結合部のための潤滑剤として作用する架橋誘導体の製造、；遊離の酸と比べた場合、ヒアルロニターゼにより安定であり、著しく作用が遅延されている誘導体の製造である。他方、上記の誘導体が治療活性なアルコールから導かれたエステル基を含有することで「遅延」効果を有する薬

物を得ることができる。これらの医薬において、薬理活性なアルコールはエステラーゼによって極めてゆっくり器官中に放出される。前記4)に従って用いるためには、新規な架橋誘導体を、特に、薬理学的に不活性なアルコール、例えば、二価の飽和脂肪族アルコール、特に炭素原子数2-8個の該アルコール、グリセリンおよび一価アルコール、とりわけ、脂肪族アルコールから調製するが、その他、上記の架橋していない、カルボシキ基の部分的なエステル化のための、一連のアルコールの内のどれかで調製してもよい。この最後の化合物群の内、とりわけ重要なのは、例えば、ビニルアルコールまたはアリルアルコールのような1またはそれ以上の二重結合を有する不飽和アルコール、およびその縮合誘導体（特にポリビニルアルコールおよびグリセリン）である。この場合においても、特定の使用目的に応じて混合エステルを用いることができる。シクロペンタンおよびシクロヘキサン、あるいはそれらの、より低級なアルキル、例えば、炭素原子数1-4個のアルキル、とりわけメチル基によって置換されている誘導体から導かれる脂環式アルコールも有用である。

化粧品に用いるには、上記の衛生、医療、及び外科的使用のために挙げた、エステル化された基と実質上同様な化合物で架橋された誘導体を用いることが好ましい。また、上記のテルペンアルコール類についても考慮すべきであり、特に、香料あるいは匂い入りのクリームを製造するためには、芳香を有するアルコールについて考慮すべきである。

本発明にかかる全ての架橋誘導体において、「架橋結合」されていない、またはエステル化されていないカルボシキ基は、遊離または塩化されていてよい。塩は、例えば、カリウムおよびとりわけナトリウムの如きアルキル金属およびアンモニウム カルシウムの如きアルカリ土類金属、又はマグネシウムおよびアルミニウム塩の如き無機塩基を含んでいるか、あるいは有機塩基、とりわけ、アゾ化された (azotated) 塩基類、従って、例えば脂肪族アミン、芳香性脂肪族アミン、環状脂肪族アミン、又は複素環式アミンを含有していてよい。これらの塩は、治療上許容し得るが、不活性なアミン、または治療活性を有するアミンから導かれ得る。

前者の内、特に考慮されるべきものは、脂肪族アミン、例えば、炭素原子数18個までのアルキル基を有するモノ、ジ、およびトリアルキルアミン、または、脂肪族部分に同数の炭素原子を有するアリールアルキルアミンであって、ここに、アリールとは、1-3個のメチル基、ハロゲン原子または水酸基によって置換されていることもあるベンゼン基を意味する。塩形成のための生物学的に不活性な塩基は、環が窒素、酸素、硫黄からなる群から選択される異種原子によって中断されていることもある炭素原子数4-6個の環からなる単環式アルキレンアミンの如き環状化合物 例え びペリジン、ピペ

ラジン、またはモルホリンであってよく、あるいは、アミノエタノール、エチレンジアミン、エフェドリンまたはコリンのようなアミノまたは水酸基によって置換されていてもよい。

又、部分エステル、4級アンモニウム塩、例えば、上記炭素原子数のテトラアルキルアンモニウム塩でもよく、この場合第4級アルキル基の炭素原子数が1-4個、例えばメチルである同タイプの塩が好ましい。

治療活性を利用し得るそれらの生物学的に活性なアミンには次に示す化合物群に含まれる、アゾ化された、および塩基性の薬物がある。アルカロイド、ペプチド、フェノチアジン、ベンゾジアゼピン、チオキサンテン、ホルモン、ビタミン、抗けいれん剤、抗精神薬、制吐剤、麻酔薬、催眠薬、食欲減退剤、トランキライザー、筋弛緩剤、冠血管拡張剤、抗新生物剤、抗生物質、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗マラリア剤、炭酸脱水酵素阻害剤、非ステロイド系抗炎症剤、血管収縮剤、コリン作動薬、コリン拮抗物質、アドレナリン作動薬、アドレナリン遮断薬、ナルコチン拮抗物質。

本明細書に記載したこれらの塩基性のアゾ化された基を有する薬物はすべて、エステルの使用例であると言い得る。エステル化されていないカルボキシ基の、治療上活性な塩基による塩化は、治療上活性なアルコールによるエステル化で得られる新規な架橋誘導体の賦形剤機能を置き換え、あるいは強化し、従って、2)の治療用賦形剤としての本発明の新規化合物の他の特別な使用例を示す。活性な塩基類は、化学量論量の塩基を付加することによって得られる中性塩、過剰量の塩基を付加することによって得られる塩基性塩、および不足量の塩基を付加することによって得られる酸類の両方、のいずれによっても、賦形剤化される。

本発明に係る新規なヒアルロン酸誘導体は、局所または局部への使用に有用であり、とりわけ、眼科的な使用において、角膜上皮への適合性に優れているので、感作作用を示す事なく、非常に良く耐容さ、殊に有用である。更に、医薬を、粘弾性を有する濃縮溶液、または固形物の状態で医薬を投与すると、角膜上皮に、ホモジニアスで安定な、完璧な透過性と完全な吸着性を有する膜(フィルム)が得られるので、薬物の生物学的利用の延長が保証され、そのために、遅延効果を有する優れた製剤が得られることになる。

これらの眼科用薬物は、今日、獣医学において、化学物質を含有している専門的な薬物がないので、獣医学分野において極めて価値がある。実際には、ヒトへの使用を意図した製品を動物に適用しており、これらの作用域は常に明確に保証されているとは限らず、特に投与すべき状況の下でも、投与することが不適当な場合がある。そのような例は、通常、牛、羊、および山羊を襲う感染症である感染性角結膜炎、急性伝染性結膜炎またはIBKの治療の場合である。おそらく、これらの3種において

は、特異的な病因学的因子が存在しており、更に詳しくは、牛において関連する主な微生物は、モラキセラ ボビズ (*Moraxella bovis*) である[しかし、羊マイコプラズマにおけるライノトラキティス・ウイルス (*Rhinotracheitis virus*)、山羊リケッチアにおけるリケッチアおよびクラミディアの如き他のウイルス起源の物質も除外すべきでない]。これらの疾患は急性症状を呈し、迅速に進行する：初期症状は眼痙攣と過剰の流涙を特徴とし、ついで、膿排出、結膜炎および角膜炎に進み、それにはしばしば発熱、食欲減退および乳生産の減少を伴うことが多い。特に深刻なのは角膜炎であって、最終段階では角膜穿孔自身に至ることもある。臨床経過は数日から数週間に及ぶ。

化学物質の局所投与(しばしばステロイド系抗炎症剤を併用する)、および全身投与、例えば、オキシテトラサイクリンのようなテトラサイクリン類、クロキサシリンやベンジルペニシリンのようなペニシリン類、サルファ剤、ポリミキシンB(ミコナゾールおよびプレズニゾロンを併用する)、クロラムフェニコール、タイロシンおよびクロロマイセチン等の投与、の両者を含む膨大な範囲に及ぶ化学物質を用いた治療が採用されている。疾患の局所治療は見掛け上単純であるが、今日までに用いられている眼科用製剤は1つのまたは別の理由から、涙分泌液中に治療有効濃度の抗生物質またはサルファ剤を得ることができないので、依然として公然の問題を有している。このことは溶液の場合、上記の動物における頭部の位置が著しく傾いていることから容易に理解し得るが、半固形製剤の場合であっても、その中に通常用いられている賦形剤は角膜表面に付着するに必要な性質を有していないので同様のことがいえる。このことは、通常、それらの活性成分濃度が、十分に高くないので、活性成分を完全に分布させることができないことによる[分布勾配(グラディエント)の存在]。これらの従来の眼科用液剤の問題点は例えば、スラッターら(Slatte r)、「Aust. vet. J.」、1982、59(3)、p. 69-72]によって記述されている。本発明のエステルによればこれらの問題点を克服することができる。実際、眼科用製剤中にヒアルロン酸の賦形剤として存在すると、活性成分の濃度勾配のない、従って、完全にホモジニアスで透過性の、角膜上皮への付着性を有する感作作用の無い、活性成分と一緒に、優れた賦形剤として作用し、遅延効果をも有する優れた製剤を製造することができる。眼科治療に用いられる新規な誘導体を含有する薬物は主として縮腫、傷の治療、抗炎症、抗微生物/抗生物質作に関連している。抗生物質の例としては、アミノグルコシッド、マクロライド、テトラサイクリンおよびペプチド、のような塩基性または非塩基性抗生物質、例えば、ゲンタマイシン、ネオマイシン、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、カナマイシン、アミカシン、トブラマイシン、スペクチノマイシン、エ

リスロマイシン、オレアンドマイシン、カルボマイシン、スピラマイシン、オキシテトラサイクリン、ロリテトラサイクリン、バシトラシン、ポリミキシンB、グラミシジン、コリスチン、クロラムフェニコール、リンコマイシン、バンコマイシン、ノボビオシン、リストセチン、クリンダマイシン、アンフォテリシンB、グリセオファルビン、ニスタチン、並びにそれらの硫酸塩や硝酸塩等の塩、更には、同一内または相互間での会合物、あるいは下記の如き他の活性物質との会合物を挙げることができる。

本発明に用いるのに有用な他の眼科用薬物はつぎの通りである：ジエチルカルバミジン、メベンダゾール、サルファセタミド、サルファジアジン、スルフイソキサゾール等のサルファ剤のような他の抗感染症剤；ヨードデオキシウリジン、アデニンアラビノシッド、トリフルオロチミジン、アシクロバー、エチルデオキシウリジン、ブロモビニルデオキシウリジン、5-ヨード-5'-アミノ-2',5'-ジデオキシウリジンのような抗ウイルスおよび抗腫瘍剤；デキサメサゾン、ヒドロコチゾン、プレニゾロン、フルオロメソロン、メドリソンおよびりん酸エステル等のそれらのエステルのようなステロイド系抗炎症剤；インドメタシン、オキシフェンブタゾン、フルルビプロフェンのような非ステロイド系抗炎症剤；上皮性成長ホルモンEGFのような傷治療剤；ベノキシナート、プロパラカインおよびその塩等の局所麻酔剤；ピロカルピン、メタコリン、カリバミルコリン、アセクリジン、フィソスチグミン、ネオスチグミン、デカメリウムおよびその塩等のコリン作動薬；アトロピンおよびその塩のようなコリン遮断薬；ノルアドレナリン、アドレナリン、ナファドリン、メトキサミンおよびその塩等のアドレナリン作動薬；プロパノール、チモロール、ピンドロール、ブウラノロール、アテノロール、メトプロロール、オキシプレノロール、プラクトロール、ブトキサミン、ソタロール、ブタドリン、ラベタロールおよびその塩等のアドレナリン遮断薬。

それ自身で、または活性な他の物質と一緒に皮膚科学において用いられる活性物質の例はつぎの通りである：抗感染症剤、抗生物質、抗微生物剤、抗炎症剤、制細胞製剤、細胞毒素、抗ウイルス剤および麻酔薬のような治療薬、および遮光（サンシールド）剤、脱臭剤、防腐剤および殺菌剤のような防御用物質。

眼科学および皮膚科学に関して述べられている例から類推して、本発明の医薬が、耳喉頭学、婦人科学、脈管学、神経学その他、直腸への作用の如く、局所の局所適用によって処置されるべき型の内臓の病理学等の様々な医療分野で用いるのに適していると考えるのは合理的である。本発明の新規な誘導体を用いて非経口投与に適した、治療活性な物質の会合（アソシエーション）物を調製することができることはもちろんである。後者の場合、注射用の水溶液を得るために、低レベルに架橋さ

れ、かつ／またはエステル化されたヒアルロン酸誘導体を選択する必要がある。極く僅かしか水に溶けないか、全く不溶の誘導体は、例えば油性溶液のような有機物質の溶液として投与する、活性物質含有会合物を形成するのに用いることができる。

本明細書に記載した局所投与型の医薬は唯2種の成分を混合物として、あるいは別個に含有する凍結乾燥粉末の如く固型の剤形で局所的に用いることができる。その様な固型剤形の薬物と処置すべき上皮との接触に際し、10 予めインビトロで調製され、特定の上皮と同様の特性を有する溶液で多少の濃縮液を形成する。このことはまた本発明のもう一つの重要な点を示している。その様な溶液は蒸留水または滅菌食塩水の溶液であることが好ましく、また、ヒアルロン酸エステル、またはその塩以外の薬学的賦形剤を含有していないことが好ましい。その様な溶液の濃度も広い制限域内で変化し得るものであり、例えば、2成分の個々について、並びにそれらの混合物または塩について、0.01~75%の範囲とすることができる。特に好ましいのは、既述の弾粘性を有する液体であり、例えば、薬物またはその構成成分を10~90%含有する溶液である。このタイプの薬物の内特に重要なものは、眼科的な使用のために、特別な殺菌性物質または賦形剤その他として作用する鉱物の塩の如き付加物あるいは補助物質を含有していることもある、無水剤形（凍結乾燥粉末）、並びに濃縮液または水または生理食塩水中の希釈液の剤形のものである。

本発明の医薬は、それを適用すべき環境に適した酸性度、即ち、生理的に耐容可能なpHのものを場合に依じて選択すべきである。pHは、例えば、上記のヒアルロン酸エステルの塩基性活性物質による塩では、多糖類、その塩、および塩基性物質自身の量を調整することにより調節される。従って、例えば、塩基性部物質によるヒアルロン酸エステルの塩の酸性度が高すぎるときには、過剰の遊離の塩基を上記無機塩基（例、ナトリウムまたはカリウム、またはアンモニウム水）によって中和する。

本発明のHYエステルの製造方法

本発明の新規な架橋誘導体は、カルボン酸類のエステル化に関する既知の方法によって製造することができ、例えば、遊離のヒアルロン酸を強い無機酸または酸型のイオン交換体等の触媒の存在下、上記の多価アルコールで処理するか、あるいは、無機または有機塩基の存在下、所望のアルコール残基を導入し得るエーテル化剤で処理することにより、製造され得る。エーテル化剤としては、文献に指示されているものを用いることができるが、特に、様々な無機酸または有機スルホン酸のエステル、水素酸、ヨウ化メチル、その他上記二価アルコールの基礎となっているアルキル基のハロゲン化アルキル等を用いる。

反応は、適当な溶媒、例えばアルコール、好ましくはカルボキシ基に導入すべきアルキル基に相当するアルコ

ールの中で行われるが、ジオキサンの様なケトンやエーテル、あるいはジメチルスルホキシドの如き中性溶媒中でも進行し得る。塩基としては、例えば、アルカリ金属、アルカリ土類金属またはマグネシウムの水和物、銀の酸化物、またはこれらの金属のあるものの塩基性の塩（炭酸塩）、並びに有機塩基、ピリジンまたはコリジンの如き4級アゾ化塩基等を用いることができる。塩基の代りに、塩基型のイオン交換体を用いてもよい。

他のエステル化法は、金属塩、あるいはアンモニウムまたは置換アンモニウム塩のような有機アゾ化塩基の塩類を用いる。アルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩を用いることが好ましいが、他の金属塩を用いることができる。上記のエーテル化剤はこの場合も適用され、溶媒についても同様のことがいえる。ジメチルスルホキシドおよびジメチルホルムアミドのような中性溶媒を用いるの好ましい。これらのエステル化法は、当然、上記の単エステルの製造にも用いられる。

前記の同時出願の米国特許出願に記載した新規な、初めての方法では、ヒアルロン酸の単エステルに関し、これらのエステルは、ヒアルロン酸の4級アンモニウム塩とエーテル化剤とを、ジアルキルスルホキシド、ジアルキルカルボキシルアミド、特に低級アルキルのジアルキルスルホキシド、とりわけジメチルスルホキシド、並びに下級脂肪酸の低級アルキルジアルキルアミド、例えばジメチルまたはジエチルホルムアミドあるいはジメチルまたはジエチルアセトアミドのような中性溶媒中で反応を開始することにより好都合に製造される。反応は、温度約0°～100°、とりわけ、約25°～75°、例えば約30°で行うのが好ましい。エステル化は、記載した溶媒の1つ、例えばジメチルスルホキシドに溶かした上記のアンモニウム塩にエステル化剤を徐々に加えることによって行うことが好ましい。

本発明の代表的な架橋エステルの製造に同一の方法を採用することができる。即ち、上記の多価アルコールから導かれるヒアルロン酸の4級アンモニウム塩に対するエーテル化剤により、2つのカルボキシ間に架橋結合が形成される。出発物質の4級アンモニウム塩としては、1～6個の炭素原子を有するアルキル基の、低級なテトラアルキル化アンモニウム類を用いることが好ましい。ヒアルロン酸テトラブチルアンモニウムが使用に最適である。これらの4級アンモニウム塩は、ヒアルロン酸の金属塩、好ましくは上記の金属塩の内の1つ、特にナトリウムまたはカリウム塩を水溶液中で、4級アンモニウム塩によって塩化されたスルホン系樹脂と反応させることにより製造される。ヒアルロン酸テトラアルキルアンモニウムは溶出液を凍結乾燥することによって得られる。

低級アルキルから導かれるヒアルロン酸テトラアルキルアンモニウム、特に炭素原子数が1～6個のアルキル基からなるものは新規であり、これもまた本発明の目

的である。予想外なことに、その様な塩は上記の中性溶媒に可溶性であることが分かり、従って、上記の新規な方法によるヒアルロン酸のエステル化は極めて容易であり、収量は大きい。従って、その様な方法によつてのみ、エステル化すべきヒアルロン酸のカルボキシ基の数を正確に割当てることができる。

前に詳述した方法の1つの変法は、ジメチルスルホキシドの如き適当な溶媒に懸濁したヒアルロン酸のナトリウムまたはカリウム塩を、触媒量のヨウ化テトラブチルアンモニウムの如き4級アンモニウム塩の存在下、適当なエーテル化剤と反応させることからなる。本発明の新規なエステルの製造には、例えば、鶏のとさかのような上記の天然の供給源から抽出した酸の如く、どのような起源のヒアルロン酸を用いてもよい。その様な酸の製造は文献に記載されている。精製されたヒアルロン酸を用いることが好ましい。本発明においては、分子量が非常に異なる、有機材料からの抽出で直接得られた、完全な酸の分子量の、例えば、約90～80%から0.2%の間で大きく変化している分子量の分子画分、好ましくは5%～0.2%の間の分子画分を含むヒアルロン酸を用いることが好ましい。これらの画分は、文献記載の様々な方法、即ち、加水分解、酸化または酵素試薬、あるいは機械的な手法や照射の如き物理的な方法により得ることができ、従って、これらの精製工程中に始原的 (primordial) 抽出物が形成されることが多い [前記の文献、バルツら、「コスメティックス・アンド・トイレットリーズ」参照]。得られた分子画分の分離および精製は、例えば、分子濾過のような既知の方法で行われる。

本発明に用いるのに適した精製HY画分の1つは、例えば、バルツによってリーフレット「ヘアロン (Healon)」—眼外科にそれを用いるための指針—ミラー (D. Miller) およびステグマン (R. Stegmann) 編、ジョンウィリー・アンド・ソン (John Wiley & Sons)、NY 81983:p. 5に記載されている「非炎症性ヒアルロン酸ナトリウム—NIF—NaHA」と命名されたものである。本発明のエステルを得る出発物質として特に重要なものは、ヒアルロン酸から得られる2つの精製画分であり、そのタイプの例は、鶏のとさかから抽出された「ヒアラスチン (Hyalastine)」と「ヒアレクチン (Hyalactin)」と名付けられたものである。ヒアラスチン画分の平均の分子量は約50,000から100,000の間であるのに対し、ヒアレクチンの平均分子量は約500,000から730,000の間である。これらの2画分と一緒にになった1つの画分も単離されており、平均分子量が約250,000から350,000であると特性化された。この一緒にになった画分は特定の出発物質から得られる全ヒアルロン酸の収率 (80%に匹敵) で得られるが、ヒアレクチン画分は出発物質HYの30%の収率で、また、ヒアラスチン画分は50%の収率で得られる。これらの画分の製造は実施例38および40に記載されている。

新規なヒアルロン酸の架橋エステルにおいて、エステル化されていないカルボキシ基は遊離状態か、塩化されているか、あるいは部分的に塩化されていてよく、従って、様々な形の架橋産物が得られる。即ち、残余のカルボキシ基は遊離しているか塩化されているか、残余のカルボキシ基は完全にエステル化されているか、または部分的にエステル化されているかであり、この後者の場合、さらに残余の基は遊離であるか、または塩化されているか。この様に、物性、特に、酸性度、粘弾性、およびゲル形成能に関する物性において異なる、あらゆる範囲の生産物を得ることができる。特定のpHの薬物を調製するためには、遊離状態に保つべき酸残基の数が重要であろう。

新規な誘導体の塩の製造は、例えば、ヒアルロン酸誘導体に、塩基としての計算量のアルカリ性水和物等、またはアルカリ金属の塩基性の塩（炭酸塩または重炭酸塩）を作用することにより行うことができる。このことは、まず、ヒアルロン酸誘導体の水溶液と塩基の水溶液を調製し、これらの物質をイオン交換体を用いてこれらの塩の水溶液から除去し、2溶液を低温で保ち（例、0°～20°）、得られた塩が水に易溶の場合には凍結乾燥するが、難溶性の塩の場合には遠心、濾過またはデカンテーションによって分離した後、乾燥することができる。有機塩基の場合、新規な架橋誘導体を賦形剤として、その様な塩基と新規な誘導体との塩として得られる薬物は、塩基を化学量論量を加えるか、あるいは塩基が不足か過剰であるかによって中性、酸性または塩基性である。

また本発明によれば、特に、既に得られた塩（精製され、無定形等の無水状態であるかもしれない）を出発物質として、処置すべき組織に接触させるときに、ゼラチン状の物性の、粘稠な、弾性を有する濃厚な水溶液を構成する上記のタイプの薬物を調製することができる。これらの性質はより大きく希釈されても維持されており、これを、賦形剤、およびpHおよび浸透圧を調整するための他の鉱物塩等の添加物を加えて水または生理食塩水の、多少濃縮された溶液として、上記の無水塩の代りに用いることができる。塩を用いて、ゲル、挿入体、クリームまたは軟膏を、これらの医薬製剤の通常の製造に用いられる賦形剤や成分を含有せしめて調製することは当然である。

本発明の新規な生産物の内、上記のエステルおよびその塩並びに以下の例示的な実施例に示した化合物は特定の事例であり、本発明を限定するものではない。

本発明はまた新規なエステルおよびその塩の製造方法の改良法であって、その方法はどの段階で途切れてもよく、または、中間体を出発物質として行う場合には、残りの段階が有効であり、あるいは、出発物質を系中で形成して行うことを含む。

本発明を以下の実施例により説明するが、これらは本

発明の範囲を制限するものでなく、実施例中、DSMOはジメチルスルホキシドを表わす、実施例に記載した生成物は多価アルコールによってエステル化された、ある割合のヒアルロン酸のカルボキシルを有し、残余の塩化され、かつ／または一価アルコールでエステル化されたカルボキシル基を有する本発明の架橋エステルを含有する。表1は、実施例1～37で得られた様々な生成物を示すものであって、明記した多価アルコールでエステル化されたカルボキシル基の数、およびナトリウム／または明記した一価アルコールでエステル化されたカルボキシル基の数が記載されている。

実施例1 エタノールにより部分的にエステル化され、1,3-プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HYの製造）。

窒素雰囲気下、高度に除湿した条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq（ミリ当量））のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加え（0.5mM）、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-3ジヨードプロパン0.074gを加え（0.25mM、0.5mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水（5:1）100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.01gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフ（Cundiff）らの方法〔アナリチカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem）33、1028、1962〕に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.56%（w/w）含まれていることが分かった（理論値は0.574%）。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。この方法によれば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.24mEq/gである（理論値は0.25）。

実施例2 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、高度に除湿した条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加え（0.5mM）、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-3ジヨードプロパン0.148gを加え（0.5mM、1mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基を

ナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.99gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.56% (w/w) 含まれていることが分かった（理論値は0.574

%）。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。この方法によれば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.36mEq/gである（理論値は0.374）。

実施例3 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、高度に除湿した条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加え (0.5mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.98gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.56% (w/w) 含まれていることが分かった（理論値は0.574

%）。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。この方法によれば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.61mEq/gである（理論値は0.623）。

実施例4 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、高度に除湿した条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.156gを加え (1mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌す

る。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.00gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが1.08% (w/w) 含まれていることが分かった（理論値は1.15

%）。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.735mEq/gである（理論値は0.747）。

実施例5 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.312gを加え (2mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.01gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.18% (w/w) 含まれていることが分かった（理論値は2.29

%）。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.98mEq/gである（理論値は0.995）。

実施例6 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、高度に除湿した条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え(4mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え(1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水(5:1)100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.00gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.5%(w/w)含まれていることが分かった(理論値は4.57%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.43mEq/gである(理論値は1.49)。

実施例7 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.934gを加え(6mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え(1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水(5:1)100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.03gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが6.74%(w/w)含まれていることが分かった(理論値は6.83%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は

1.96mEq/gである(理論値は1.98)。

実施例8 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル1.170gを加え(7.5mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え(1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水(5:1)100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.02gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが8.46%(w/w)含まれていることが分かった(理論値は8.52%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は2.28mEq/gである(理論値は2.34)。

実施例9 エタノールにより部分的にエステル化され、1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え(4mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-3ジヨードプロパン0.592gを加え(2mM、4mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水(5:1)100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.99gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.42%(w/w)含まれていることが分かった(理論値は4.57%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化

反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.96mEq/gである（理論値は1.99）。

実施例10 エタノールにより部分的にエステル化され、1-4ブタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.312gを加え（2mM）、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-3ジヨードプロパン0.310gを加え（1mM、2mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水（5:1）100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.02gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.3%（w/w）含まれていることが分かった（理論値は2.28%）。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.97mEq/gである（理論値は0.99）。

実施例11 エタノールにより部分的にエステル化され、1-4ブタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え（4mM）、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-4ジヨードブタン0.310gを加え（1mM、2mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水（5:1）100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.95gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.25%（w/w）含まれていることが分かった（理論値は2.28%）。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.41mEq/gである（理論値は1.48）。

実施例12 エタノールにより部分的にエステル化され、1-4ブタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.936gを加え（6mM）、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-4ジヨードブタン0.310gを加え（1mM、2mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水（5:1）100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.98gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが6.69%（w/w）含まれていることが分かった（理論値は6.81%）。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.91mEq/gである（理論値は1.97）。

実施例13 エタノールにより部分的にエステル化され、1-6ヘキサジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.312gを加え（2mM）、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-6ジブromoヘキサン0.244gを加え（1mM、2mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.05gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.18% (w/w) 含まれていることが分かった(理論値は2.27%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.96mEq/gである(理論値は0.985)。

実施例14 エタノールにより部分的にエステル化され、1-6ヘキサンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え(2mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-6ジブロモヘキサン0.244gを加え(1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.02gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.46% (w/w) 含まれていることが分かった(理論値は4.52%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.43mEq/gである(理論値は1.47)。

実施例15 エタノールにより部分的にエステル化され、1-6ヘキサンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.934gを加え(6mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-6ジブロモヘキサン0.244gを加え(1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.00gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが6.68% (w/w) 含まれていることが分かった(理論値は6.76%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.91mEq/gである(理論値は1.96)。

実施例16 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加え(0.5mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-8ジブロモオクタン0.068gを加え(0.25mM、0.5mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.99gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法(既述)に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.54% (w/w) 含まれていることが分かった(理論値は0.571%)。過剰量の1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.23mEq/gである(理論値は0.25)。

実施例17 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加

え (0.5mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。
1-8ジブロモオクタン0.136gを加え (0.5mM、1mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.97gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフ等の方法 (既述) に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.55% (w/w) 含まれていることが分かった (理論値は0.569%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.35mEq/gである (理論値は0.37)。

実施例18 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.078gを加え (0.5mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-8ジブロモオクタン0.272gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.05gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法 (既述) に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが0.55% (w/w) 含まれていることが分かった (理論値は0.564%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.60mEq/gである (理論値は0.61)。

実施例19 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒア

ルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.156gを加えて (1mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。

1-8ジブロモオクタン0.272gを加えて (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.01gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法 (既述) に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが1.09% (w/w) 含まれていることが分かった (理論値は1.13%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.70mEq/gである (理論値は0.73)。

実施例20 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.312gを加え (2mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-8ジブロモオクタン0.272gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.05gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法 (既述) に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.05% (w/w) 含まれていることが分かった (理論値は2.25%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従

えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 0.96mEq/g である（理論値は 0.98）。

実施例 21 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8 オクタジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩 6.21g を、DMSO 248ml に溶解する。ヨウ化エチル 0.624g を加えて (4mM)、得られた溶液を 30℃ で 15 時間攪拌する。1-8 ジブロモオクタン 0.272g を加え (1mM、2mEq に相当し)、均一にした後、この溶液を 30℃ で 24 時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水 100ml に NaCl 2.5g を溶かした水溶液を加える。

アセトン 500ml を加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100ml で 3 回、アセトン 100ml で 3 回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物 3.99g が得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが 4.39% (w/w) 含まれていることが分かった（理論値は 4.49%）。過剰量の 0.1N NaOH を用いて 50℃ で 30 分間ケン化反応を行ない、全エステルの分析を行う。過剰量の NaOH は、指示薬としてフェノールフタレインを用いた 0.1N HCl による滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 1.43mEq/g である（理論値は 1.46）。

実施例 22 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8 オクタジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩 6.21g を、DMSO 248ml に溶解する。ヨウ化エチル 0.934g を加えて (6mM)、得られた溶液を 30℃ で 15 時間攪拌する。1-8 ジブロモオクタン 0.272g を加え (1mM、2mEq に相当し)、均一にした後、この溶液を 30℃ で 24 時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水 100ml に NaCl 2.5g を溶かした水溶液を加える。

アセトン 500ml を加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100ml で 3 回、アセトン 100ml で 3 回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物 4.10g が得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが 6.66% (w/w) 含まれていることが分かった（理論値は 6.72

%)。過剰量の 0.1N NaOH を用いて 50℃ で 30 分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量の NaOH は、指示薬としてフェノールフタレインを用いた 0.1N HCl による滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 1.89mEq/g である（理論値は 1.94）。

実施例 23 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8 オクタジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩 6.21g を、DMSO 248ml に溶解する。ヨウ化エチル 1.170g を加えて (7.5mM)、得られた溶液を 30℃ で 15 時間攪拌する。1-8 ジブロモオクタン 0.272g を加え (1mM、2mEq に相当し)、均一にした後、この溶液を 30℃ で 24 時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水 100ml に NaCl 2.5g を溶かした水溶液を加える。

アセトン 500ml を加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100ml で 3 回、アセトン 100ml で 3 回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物 4.03g が得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法（既述）に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが 8.27% (w/w) 含まれていることが分かった（理論値は 8.38%）。過剰量の 0.1N NaOH を用いて 50℃ で 30 分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量の NaOH は、指示薬としてフェノールフタレインを用いた 0.1N HCl による滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は 2.05mEq/g である（理論値は 2.3）。

実施例 24 エタノールにより部分的にエステル化され、1-8 オクタジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩 6.21g を、DMSO 248ml に溶解する。ヨウ化エチル 0.624g を加えて (4mM)、得られた溶液を 30℃ で 15 時間攪拌する。1-8 ジブロモオクタン 0.544g を加え (1mM、2mEq に相当し)、均一にした後、この溶液を 30℃ で 24 時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水 100ml に NaCl 2.5g を溶かした水溶液を加える。

アセトン 500ml を加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100ml で 3 回、アセトン 100ml で 3 回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.15gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.36% (w/w) 含まれていることが分かった (理論値は4.42%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.90mEq/gである (理論値は1.92)。

実施例25 エタノールにより部分的にエステル化され、1-10デカンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.312gを加え (2mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-10ジブロモデカン0.300gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシ基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.12gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが2.12% (w/w) 含まれていることが分かった (理論値は2.24%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.94mEq/gである (理論値は0.97)。

実施例26 エタノールにより部分的にエステル化され、1-10デカンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え (4mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-10ジブロモデカン0.300gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシ基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5g

を溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.10gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.36% (w/w) 含まれていることが分かった (理論値は4.46%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.43mEq/gである (理論値は1.45)。

実施例27 エタノールにより部分的にエステル化され、1-10デカンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.934gを加え (6mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。1-10ジブロモデカン0.300gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシ基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.12gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが6.5% (w/w) 含まれていることが分かった (理論値は6.67%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.87mEq/gである (理論値は1.93)。

実施例28 エタノールにより部分的にエステル化され、 α 、 α' -パラキシレンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ化エチル0.624gを加え (4mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。

α 、 α' -ジブロモ-p-キシレン0.264gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24

時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.04gが得られる。

エトキシル基定量法をクンディフらの方法に従って行ない、得られた化合物にはエタノールが4.4% (p/p) 含まれていることが分かった (理論値は4.5%)。過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.36mEq/gである (理論値は1.47)。

実施例29 ベンジルアルコールより部分的にエステル化され、1-8オクタジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。臭化ベンジル0.342gを加え (2mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。ジブromoオクタン0.272gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.15gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.93mEq/gである (理論値は0.95)。

実施例30 ベンジルアルコールにより部分的にエステル化され、 α 、 α' -パラキシレンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。臭化ベンジル0.342gを加え (2mM)、得られた溶液を30℃で15時間攪拌する。

α 、 α' -ジブromo-p-キシレン0.264gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24

時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.11gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.92mEq/gである (理論値は0.95)。

実施例31 1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。1-3ジヨードプロパン0.296gを加え (1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.98gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.47mEq/gである (理論値は0.499)。

実施例32 1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸 (HY) の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY (10mEq) のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。1-3ジヨードプロパン0.740gを加え (2.5mM、5mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水 (5:1) 100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.89gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.21mEq/gである（理論値は1.25）。

実施例33 1-3プロパンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、高度に除湿した条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。1-3ジヨードプロパン1.184gを加え（4mM、8mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水（5:1）100mlで3回、アセトン100mlで3回洗淨し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.87gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は1.97mEq/gである（理論値は2.00）。

実施例34 1-4ブタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。1-4ジヨードブタン0.310gを加え（1mM、2mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水（5:1）100mlで3回、アセトン100mlで3回洗淨し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.00gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.492mEq/gである（理論値は0.497）。

実施例35 1-6ヘキサジオールにより部分的に架橋

されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。テトラブチルアンモニウム・ヨウ化物塩0.370gを加え（1mM）、得られた溶液を20℃で1時間攪拌する。1-6ジブロモヘキサン0.224gを加え（1mM、2mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水（5:1）100mlで3回、アセトン100mlで3回洗淨し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.01gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.486mEq/gである（理論値は0.494）。

実施例36 1-8オクタンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。テトラブチルアンモニウム・ヨウ化物塩0.370gを加え（1mM）、得られた溶液を20℃で1時間攪拌する。1-8ジブロモオクタン0.272gを加え（1mM、2mEqに相当）、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水／氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン／水（5:1）100mlで3回、アセトン100mlで3回洗淨し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.02gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.478mEq/gである（理論値は0.490）。

実施例37 1-10デカンジオールにより部分的に架橋されたヒアルロン酸（HY）の製造。

窒素雰囲気下、完全な乾燥条件下かつ遮光下、25℃の温度で、HY（10mEq）のテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、DMSO248mlに溶解する。ヨウ素0.369gを加え（1m

M)、得られた溶液を20℃で1時間攪拌する。1-10ジブロモデカン0.300gを加え(1mM、2mEqに相当)、均一にした後、この溶液を30℃で24時間放置する。

残ったテトラブチルアンモニウム・カルボキシル基をナトリウム塩に変換するため、この溶液に、水/氷浴を用いて外側から冷却しながら、蒸留水100mlにNaCl2.5gを溶かした水溶液を加える。

アセトン500mlを加え、濾過して沈澱物を分離し、アセトン/水(5:1)100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、次いで減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物3.99gが得られる。

過剰量の0.1N NaOHを用いて50℃で30分間ケン化反応を行ない、全エステル基の分析を行う。過剰量のNaOHは、指示薬としてフェノールフタレインを用いた0.1N HClによる滴定によって測定する。このような方法に従えば、全エステル基の測定が可能であり、その含有量は0.476mEq/gである(理論値は0.487)。

実施例37A オクタンジオールおよびコルチゾンにより混同して部分的に架橋されたヒアルロン酸(HY)[オクタンジオールによりエステル化されたカルボキシル基40%、コルチゾン(C₂₁)によりエステル化されたカルボキシル基20%、塩化されたカルボキシル基40%]の製造。

HYのテトラブチルアンモニウム塩(分子量125,000)の単量体6.2g(10mEqに対応)を、ジメチルスルホキシド310mlに温度25℃にて溶解し、1-8ジブロモオクタン1.09g(4mEq)を加え、得られた溶液を30℃にして24時間放置する。21-ブromo-4-プレグネン-17 α -1-3,11,20-トリオン0.85g(2mEq)を加え、この溶液を30℃にて24時間放置する。

次いで、塩化ナトリウム5gの水溶液(100ml)を加え、得られた混合物を、一定速度で攪拌させながらアセトン2,000mlにゆっくりと注加する。濾過して得た沈澱物を、アセトン/水(5:1)100mlで3回、アセトン100mlで3回洗浄し、最後に30℃で8時間減圧乾燥する。

これにより、標題に示した化合物4.5gが得られる。

Na₂CO₃の水性アルコール溶液を用いて穏やかにアルカリ性加水分解を行い、クロロホルムで抽出した後、ブリティッシュ・ファーマコピア(British Pharmacopea)[1980、224頁]に従ってコルチゾンの定量を行った。

第 1 表

各種架橋化合物の組成パーセンテージ(百分率)

| 実施例番号 | エステル化百分率 ^{a)} | 架橋百分率 ^{b)} | 塩化百分率 ^{c)} |
|-------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| 1 | 5/CH ₃ -CH ₂ - | 5/-(CH ₂) ₃ - | 90 |
| 2 | 5/CH ₃ -CH ₂ - | 10/-(CH ₂) ₃ - | 85 |
| 3 | 5/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₃ - | 75 |
| 4 | 10/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₃ - | 70 |
| 5 | 20/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₃ - | 60 |

| 実施例番号 | エステル化百分率 ^{a)} | 架橋百分率 ^{b)} | 塩化百分率 ^{c)} |
|-------|---------------------------------------|--|---------------------|
| 6 | 40/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₃ - | 40 |
| 7 | 60/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₃ - | 20 |
| 8 | 75/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₃ - | 5 |
| 9 | 40/CH ₃ -CH ₂ - | 40/-(CH ₂) ₃ - | 20 |
| 10 | 20/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₄ - | 60 |
| 11 | 40/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₄ - | 40 |
| 12 | 60/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₄ - | 20 |
| 13 | 20/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₆ - | 60 |
| 14 | 40/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₆ - | 40 |
| 15 | 60/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₆ - | 20 |
| 16 | 5/CH ₃ -CH ₂ - | 5/-(CH ₂) ₈ - | 90 |
| 17 | 5/CH ₃ -CH ₂ - | 10/-(CH ₂) ₈ - | 85 |
| 18 | 5/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₈ - | 75 |
| 19 | 10/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₈ - | 70 |
| 20 | 20/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₈ - | 60 |
| 21 | 40/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₈ - | 40 |
| 22 | 60/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₈ - | 20 |
| 23 | 75/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₈ - | 5 |
| 24 | 40/CH ₃ -CH ₂ - | 40/-(CH ₂) ₈ - | 20 |
| 25 | 20/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₁₀ - | 60 |
| 26 | 40/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₁₀ - | 40 |
| 27 | 60/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₁₀ - | 20 |
| 28 | 40/CH ₃ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂ -O-CH ₂)- | 40 |
| 29 | 20/ ϕ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂) ₈ - | 60 |
| 30 | 20/ ϕ -CH ₂ - | 20/-(CH ₂ -O-CH ₂)- | 60 |
| 31 | - | 20/-(CH ₂) ₃ - | 80 |
| 32 | - | 50/-(CH ₂) ₃ - | 50 |
| 33 | - | 80/-(CH ₂) ₃ - | 20 |
| 34 | - | 20/-(CH ₂) ₄ - | 80 |
| 35 | - | 20/-(CH ₂) ₆ - | 80 |
| 36 | - | 20/-(CH ₂) ₈ - | 80 |
| 37 | - | 20/-(CH ₂) ₁₀ - | 80 |

a) 数字は右列の基によってエステル化されたカルボキシル基数の百分率

b) 数字は右列の基によって架橋されたカルボキシル基数の百分率

c) 数字はナトリウムによって塩化されたカルボキシル基数の百分率

実施例38 炎症作用を持たないヒアラスチン画分とヒアレクチン画分との混合物を得る方法

新鮮な、または凍結した鶏のとさか(300g)をミンサーで刻んだ後、機械的なホモジナイザーで注意深くホモジナイズする。この様にして得られたペーストをAISIステンレス鋼製の容器またはガラスに入れ、10容量の無水アセトンで処理する。全体を50rpmで6時間攪拌する。12時間放置して分離させた後、アセトンを吸い上げて除去する。捨てたアセトンの湿度が適正になるまでアセト

ン抽出を繰り返す（カール・フィッシャー法）。次いで、全体を遠心し、適当な温度で5～8時間減圧乾燥する。かくして鶏とさかの乾燥粉末約500～600gが得られる。

乾燥粉末300gを、りん酸バッファーで緩衝化した水性溶媒中で、適量の塩酸シスチンの存在下、パパイン(0.2g)により酵素消化する。60～65℃の定温において、60rpmで24時間攪拌する。次いで、全体を25℃に冷却してセライト（CeliteR）（60g）を加え、更に1時間攪拌を続ける。得られた混合物を、透明な液体が得られるまで濾過する。この透明な液体を分子排除限界30,000のメンブランで分子限外濾過することにより、メンブラン上に分子量30,000以上の分子を得る。

限外濾過される生成物に蒸留水を連続的に加えながら、元の体積の5～6倍容量を限外濾過する。水の添加を保留し、元の体積の1/3に減少されるまで限外濾過を続ける。塩化ナトリウムを加えて残りの液体を0.1M塩化ナトリウムとし、温度を50℃にする。60rpmで攪拌しながらセチルピリジニウム・クロライド45gを加える。60分間攪拌した後、CeliteR50gを加える。攪拌下、全体の温度を25℃にし、析出した沈澱を遠心して集める。得られた沈澱を0.5%セチルピリジニウム・クロライドを含んだ0.01M塩化ナトリウム溶液（5ℓ）に懸濁する。これを50℃で60分間攪拌する。次いで温度を25℃にして沈澱を遠心する。3回洗浄を行い、最後に、0.5%セチルピリジニウム・クロライドを含んだ0.05M塩化ナトリウム溶液3ℓの入った容器に集める。

60rpmで60分間攪拌し、温度を2時間、25℃の定温に保つ。上清を遠心して除く。0.05%セチルピリジニウム・クロライドを含んだ0.1M塩化ナトリウム溶液を用いて数回、この工程を繰り返す。混合物を遠心し、上清を捨てる。沈澱を0.5%セチルピリジニウム・クロライドを含んだ0.30M塩化ナトリウム溶液（3ℓ）に分散させる。この混合物を攪拌し、沈澱を透明な液体の両者を集める。沈澱については、同一の水溶液0.5ℓづつを用いて3回抽出を繰り返す。

最後に、残渣沈澱を捨て、1個の容器に透明な液体をとる。攪拌しながら液体の温度を50℃にする。次いで、液体を塩化ナトリウムで、0.23Mにする。セチルピリジニウム・クロライド1gを加え、12時間攪拌を続ける。

混合物を25℃に冷却した後、まずCeliteRで、次にフィルターで濾過する。次いで、分子排除限界30,000のメンブランで分子限外濾過し、0.33M塩化ナトリウムを加えて初期容量の3倍の容量で限外濾過する。塩化ナトリウム溶液の添加を中止して容量を1/4に減少する。このようにして濃縮した溶液を3容量のエタノール（95%）と一緒に25℃で攪拌（60rpm）すると沈澱が析出する。遠心して沈澱を集め、上清を捨てる。沈澱を0.1M塩化ナトリウム溶液1ℓに溶かし、3容量の95%エタノールで沈澱を繰り返す。沈澱を採取し、まず75%エタノールで

3回、次いで無水エタノールで3回、最後に無水アセトンで3回洗浄する。

このようにして得られる生成物（ヒアラスチン+ヒアレクチン）の平均分子量は250,000～350,000である。

HYの収率は最初の新鮮な組織に対して0.6%に相当する。

実施例39 実施例38に記載の方法で得られた混合物からヒアラスチン画分を得る方法

実施例38に記載の方法で得られた混合物を発熱物質不含の蒸留水に、水1mlについて生成物10mgの割合で溶かす。得られた溶液を分子排除限界200,000のフィルターメンブランを用い、メンブランの頂部から水を加えることなく、濃縮法で分子濾過する。分子排除限界200,000のメンブランで限外濾過を行うと、この間に、200,000以上の分子量を持つ分子は通過することができないが、それにより小さい分子は水と一緒にメンブランを通過する。濾過工程の間、メンブランの頂部に水を加えないので、その結果、容量が減少し、分子量200,000以上の分子の濃度が増大する。メンブランの頂部の容量が初期容量の10%に減少されるまで限外濾過を続ける。2容量の発熱物質不含の蒸留水を加え、元の容量の1/3に減少されるまで限外濾過を続ける。さらに2回操作を繰り返す。メンブランを通過した溶液を塩化ナトリウムで0.1Mにし4容量の95%エタノールにより沈澱させる。沈澱を75%エタノールで3回洗浄した後、減圧乾燥する。

このようにして得られる生成物（ヒアラスチン画分）の平均分子量は50,000, 100,000である。

HYの収率は最初の出発物質である新鮮な組織について、0.4%に相当する。

実施例40 ヒアレクチン画分を得る方法

実施例39の如くにして分子排除限界200,000の限外濾過メンブランの頂部にある容器に採取した濃縮液を、グルクロン酸の用量に基づく定量分析測定によって5mg/mlヒアルロン酸含有溶液が得られるまで水で希釈する。

溶液を塩化ナトリウムで0.1Mにし、次いで、4容量の95%エタノールで沈澱させる。沈澱を75%エタノールで3回洗浄した後、減圧乾燥する。

このようにして得られた生成物（ヒアレクチン画分）の分子量は500,000～730,000である。これは分子鎖測定値が約2,500～3,500糖単位の精製度の高い、特定のヒアルロン酸画分に対応する。HYの収率は元の新鮮な組織出発物質の0.2%に相当する。

実施例41 ヒアルロン酸の架橋誘導体、および様々なアルコールによる部分的エステル化誘導体のフィルムの調製

実施例6～15、19～20および37のようにして全成分を加えた後、ホモジナイズして得たDMSO溶液をガラス皿に所望の厚みで重層し、窒素雰囲気下、完全な除湿条件下、遮光して24時間おく。

このようにして得られた架橋し、エステル化されたヒ

アルロン酸誘導体のフィルムであって、テトラブチルアンモニウム・カルボキシ基が存在しているフィルムを、まず、1%NaCl、次いで蒸留水に対し、溶液を定期的に交換しながら4℃で透析する。上記の架橋誘導体のナトリウム塩を含んだフィルムを次に、2枚のセロファン膜の間に挟み、スラブドライヤー中、37℃で減圧乾燥する。

薬物製品および医薬製剤

本発明の新規な架橋誘導体およびその塩を活性物質とする医薬製剤は、その架橋誘導体がさらに治療活性なアルコールでエステル化されており、さらに／または塩化されていてもよく、HYそのものの特徴と同じ目的のもの、および、治療活性なアルコールのエステルの場合には、そのアルコールの特徴に相当する用途を意図しているもの、のいずれの場合であっても、通常の賦形剤を含有し、経口、経直腸、非経口、皮下、局部、皮内、あるいは局所的に用いられる。従って、それらは丸剤、錠剤、ゼラチンカプセル剤、カプセル剤、座薬、軟ゼラチンカプセル剤等の固形または半固形の剤形をとる。非経口および皮下投与のためには、筋肉内または皮内投与のための剤形、あるいは注入、または静注に適した剤形を用いることができる。従って、本発明の活性物質を、溶液または凍結乾燥粉末として、活性化合物を薬学的に許容しうる1またはそれ以上の賦形剤または希釈剤（生理的な液体に適合した浸透圧型を有する）とプールしておく、と、上記の使用に便利である。局部使用については、鼻スプレーのようなスプレー製剤をも考慮すべきであり、硬膏剤の局所使用のためのクリームまたは軟膏は、皮内投与用に適切に製造され得る。

本発明の製剤はヒトまたは動物への投与を目的とするものである。それらは、溶液、スプレー、軟膏およびクリームの場合には活性物質を0.01-10%、固形剤形の場合には1-100%、好ましくは5-50%含有している。投与すべき用量は、所望の効果および選択された投与経路に関する指示に従って変化しうる。そのような製剤の1日当たりの用量は、例えばヒトまたは馬に対する、関節炎の治療等の対応する治療におけるヒアルロン酸の使用、並びにその活性を利用すべき治療活性なアルコールの両者について、既知の対応する製剤における使用から推測しうる。従って、例えば、コーチゾンと併せたヒアルロン酸エステルの用量は、そのエステル中の含有量および既知の医薬製剤中の通常の用量から導かれる。

化粧品製品においては、本発明の新規な架橋誘導体およびその塩を、当該技術分野で通常用いられている賦形剤、例えば既に医薬製剤に関して列挙したもの、と混合する。特に、局所使用のためのクリーム、軟膏、ローションは、プレグネノロンのようなステロイド、または上記の活性物質等の活性な化粧品用物質を付加して構成され得る。これらの製品中での本発明の新規な架橋誘導体は、既述の低級脂肪族アルコールのような化粧品活性を

有しないアルコールのエステルであることが望ましい。これらの製品においては、化粧品効果は、遊離のヒアルロン酸またはその塩の場合のように、多糖類の本来の性質によっている。

しかしながら、化粧品製品はヒアルロン酸の作用とは異なる特異的な作用を有する物質、例えば、殺菌剤、遮光剤、防水剤、または再生性物質、しわ防止剤または発香性物質に基づいていてもよい。この場合、本発明の新規な架橋誘導体はそれ自身が活性物質であって、それらの性質を有するアルコールから導かれたもの、例えば香水の場合、高級脂肪酸アルコールまたはテルペンアルコールから導かれるものであるか、あるいは、特に、それに伴っている、そのような性質を有する性質のための賦形剤として機能するものであってよい。従って、特に重要なのは、前記の薬剤において、薬学的に活性な成分を化粧品学的な因子で置き換えた、薬物類似の化粧品組成物である。

香料工業において用いられているアルコールから導かれる上記エステルの使用は、発香成分の緩慢かつ一定した、遅延された放出を可能にするので、技術の重要な進歩である。

本発明の重要な応用の1つは既述の衛生および外科用製品、その製造および方法に係る。従って本発明は、市場化されている、ヒアルロン酸含有製品と同様の製品であるが、遊離の酸またはその塩の代わりに本発明の架橋誘導体をも含有している製品、例えば挿入体または眼科用レンズ等を包含する。

本発明の完全に新規な衛生および外科用製品は、シートまたは糸状に形成しうる適当な有機溶媒によってそのように再生し、外科用のフィルム、シートおよび糸に形成し、火傷後の皮膚の深刻な損傷の場合における皮膚補助または代用品、あるいは外科的な縫合用の糸を得る。特に本発明はこれらの使用法およびこれらの製品の1つの製造方法であって、(a) ヒアルロン酸またはその塩の1つを、ケトン、エステル、またはカルボン酸アミド、特に1-5個の炭素原子を有し、炭素原子数1-6個のアルキル基から導かれた脂肪族酸のジアルキルアミド、特に、有機スルホキシドからえられるもの即ち、炭素原子数6個までのアルキル基を有するジアルキルスルホキシド、特にジメチルスルホキシド、ジメチルスルホキシド、のような中性溶媒、更にまた第一に、低沸点のフッ化溶媒、特にヘキサフルオロイソプロパノール等の適当な有機溶媒中溶液とし、(b) この溶液をシート又は糸状に成形し、(c) 第1の溶媒とは混ざり合うが、その中にヒアルロン酸エステルが溶けることのない別の有機または水性溶媒、特に、エチルアルコールのような低級脂肪族アルコール（湿式紡績、Wet spinning）と接触させることにより有機溶媒を除く、または、ヒアルロン酸誘導体の溶液を調製するのに左程高くない沸点の溶媒を用いたときにはこの溶媒をガス気流により、特に適

当に過熱した窒素の存在下で除去する（乾式紡績法、Dry spinning）。

本発明除新規な架橋誘導体から得られた糸は、傷または外科の医療に用いるリントの製造に有用である。そのようなリントを用いると、それが含有している酵素の作用によって器官内で生物分解を受けるので極めて好都合である。これらの酵素はエステルを、ヒアルロン酸と対応するアルコールおよび既に期間内に存在している化合物、あるいは、アルコールのような無害な化合物とに分解する。従って、そのようなリント、および上記の糸は、該分解作用によって、徐々に吸収されるので、それを術後も生体内に残しておくことができる。

上記の衛生および外科用製品の製造において、機械的特性を促進する（糸の場合には、絡まりにたいする抵抗を増強する）ために可塑剤を加えると好都合である。これらの可塑剤は例えば、脂肪酸のアルカリ塩、例えば、ステアリン酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、多数の炭素原子を有する有機酸のエステル等である。

本発明の新規な架橋誘導体の生物分解性を生物内に存在しているエステラーゼを介して利用する他の応用例は、医薬の皮下埋め込み用のカプセルの製造、または皮下または筋肉内注射等のためのマイクロカプセルの製造である。皮下薬物を徐々に放出し、「遅延」作用をもって適用するために、今日までシリコン材料のカプセルが用いられてきたが、そのようなカプセルは器官内を移動しやすく、回収が不可能であるという不利益を有していた。本発明の新規な架橋誘導体に、このようなおそれのないことは明らかである。又、本発明の新規な架橋誘導体を含有するマイクロカプセルは今日までその使用を極めて制限されていた、その使用に伴う問題点を回避しているという点で重要である。この製剤は、注射による「遅延」効果が得られる、という適用の全く新しい境地を拓くものである。

更に本発明の新規な架橋誘導体の医療および外科の分野での応用例は、プレート、ディスクおよびシート等の様々な固形挿入体の製造にあり、これらは今日用いられている合成プラスチック材料を含んだ金属性のもの（この場合、ある期間の経過後、関連の挿入体を除去することを意図して用いる）の代わりとなる。動物のコラーゲンを含有する製剤はそれがタンパク性であるために炎症や拒絶反応のような不快な反応を引き起こす。本発明の新規な架橋誘導体の場合、ヒトヒアルロン酸でなく、動物起源であっても、種々の動物種で多糖類に関しては不適合が存在しないので、このような危険性は生じない。

もう 1 つの用途は軟組織の損傷の修正および増加であ

る。除去された、または損傷された軟組織の代替となる、安全かつ有効な生物材料の必要性が時折感じられていた。パラフィン、テフロンペースト、シリコンおよびウシコラーゲン等の多くの同種移植形成術用材料が、失われた軟組織の代わりに用いられていた。しかしながら、これらの材料は、その場所で動き、負の反応を伴い、皮膚組織に望ましくない、永久的な変化をもたらす。。従って、医療分野で多方面に用いられる生物材料への要望は根強い。本発明の新規な架橋誘導体は丘疹、術後の萎縮性異常、モー（Mohs）の化学的外科、口唇の裂傷、加齢によるしわ等の損傷を修正するために用いて安全かつ有効である。

本発明の新規な架橋誘導体の医療および外科分野への適用には、様々な性質の傷または病巣の医療のための膨張性材料からなる製剤、特にスポンジ状の製剤が含まれる。

以下に製剤例を挙げ、本発明の代表的な製剤を示す。

製剤例 1 コーチゾンを含むコリリウム (Collirium)

| | | |
|----|---|----------|
| 20 | 成分 | 100ml 中 |
| | ヒアルロン酸のコーチゾンおよびオクタンジオールとの部分的かつ混合エステル (実施例37A) | 0.300g |
| | p-オキシ安息香酸エチル | 0.010g |
| | p-オキシ安息香酸メチル | 0.050g |
| | 塩化ナトリウム | 0.900g |
| | 注射製剤用の水/g. b. a. | 100.00ml |

製剤例 2 ヒアルロン酸と1,3-プロパンジオールとの部分エステルを含むクリーム

| | | |
|----|-------------------------------------|--------|
| 30 | 成分 | g/100g |
| | ヒアルロン酸と1,3-プロパンジオールとの部分エステル (実施例31) | 0.2 |
| | モノステアリン酸ポリエチレングリコール 400 | 10.000 |
| | セチオールV | 5.000 |
| | ラネッテSX | 2.000 |
| | パラオキシ安息香酸メチル | 0.075 |
| | パラオキシ安息香酸プロピル | 0.050 |
| 40 | ジヒドロ酢酸ナトリウム | 0.100 |
| | グリセリンF.U | 1.500 |
| | ソルビトール70 | 1.500 |
| | テストクリーム | 0.050 |
| | 注射製剤用の水/g. b. a. | 100.00 |

フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|-------|--------|---------------|--------|
| A 6 1 L 15/16 | | | A 6 1 L 27/00 | D |
| 27/00 | | | C 0 8 L 5/08 | L A X |
| C 0 8 L 5/08 | L A X | | A 6 1 L 15/01 | |

(56) 参考文献 特開 昭60-233101 (J P, A)
特開 昭49-16780 (J P, A)
特開 昭54-52189 (J P, A)
欧州公開193510 (E P, A 1)